



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In Re the Application of : **Takaaki SORIN, et al.**
Filed : **February 6, 2004**
For : **SURFACE PLASMON...**
Serial No. : **10/774,327**
Examiner :
Art Unit :
Confirmation No. :

Director of the U.S. Patent and
Trademark Office
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

April 20, 2004

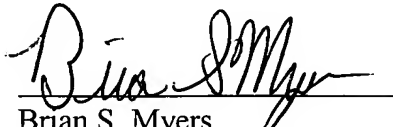
PRIORITY CLAIM AND
SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

S I R:

Applicant hereby claims priority under 35 USC 119 from **JAPANESE** patent application nos. **2001-238883** filed on **August 7, 2001** & **2001-238884** filed on **August 7, 2001**, certified copies of which are enclosed.

Any fee, due as a result of this paper may be charged to Deposit Acct. No. 50-1290.

Respectfully submitted,


Brian S. Myers
Reg. No. 46,947

CUSTOMER NO.: 026304
TELEPHONE: (212) 940-8800
FAX: (212) 940-8986
DOCKET NO.: SAN 20.947(100946-00058)

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2001年 8月 7日

出 願 番 号
Application Number:

特願2001-238883

[ST.10/C]:

[JP 2001-238883]

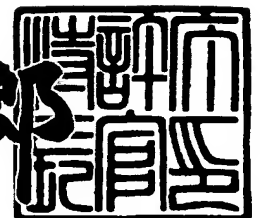
出 願 人
Applicant(s):

三菱化学株式会社

2002年 9月10日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2002-3070135

【書類名】 特許願

【整理番号】 J07206

【提出日】 平成13年 8月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/543 595
G01N 21/47

【発明の名称】 表面プラズモン共鳴センサチップ、並びにそれを用いた
試料の分析方法及び分析装置

【請求項の数】 7

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱化学
株式会社内

【氏名】 高山 英士

【特許出願人】
【識別番号】 000005968
【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代理人】
【識別番号】 100092978
【弁理士】
【氏名又は名称】 真田 有
【電話番号】 0422-21-4222

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 007696
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 9802014

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 表面プラズモン共鳴センサチップ、並びにそれを用いた試料の分析方法及び分析装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料と接するセンサ面の近傍に金属層と回折格子とが設けられて、光の照射により上記金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と上記回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面に形成された表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、

上記共鳴領域は上記センサ面に離散的に形成された複数の連続領域からなり、上記複数の連続領域のうち少なくとも一つの連続領域は他の連続領域とは上記回折格子の溝ピッチ及び溝方向のうち少なくとも一つの要素が相違していることを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項 2】 試料と接するセンサ面の近傍に金属層と回折格子とが設けられて、光の照射により上記金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と上記回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面に形成された表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、

上記共鳴領域は上記センサ面に連続的に形成された連続領域を有し、上記連続領域は上記回折格子の溝ピッチに連続的或いは不連続的な分布を有していることを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項 3】 上記共鳴領域の表面に試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化されている

ことを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項 4】 請求項 3 記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、

上記センサ面に試料を接触させて、所定の方向から光を照射する光照射ステップと、

上記共鳴領域からの反射光を受光し、受光した上記共鳴領域からの反射光の強度に基づき、上記共鳴領域での上記共鳴現象を検出する検出ステップと、

上記共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質

的な溝ピッチに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析ステップとを備えた

ことを特徴とする、分析方法。

【請求項 5】 上記分析ステップにおいて、上記共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質的な溝ピッチ、及び上記共鳴現象が検出された位置における反射光の強度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う

ことを特徴とする、請求項 4 記載の分析方法。

【請求項 6】 請求項 3 記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記センサ面に上記試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記共鳴領域に向けて所定の方法から光を照射する光照射手段と、

上記共鳴領域からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記共鳴領域からの反射光の強度に基づき、上記共鳴領域での上記共鳴現象を検出する検出手段と、

上記共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質的な溝ピッチに基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えた

ことを特徴とする、分析装置。

【請求項 7】 上記分析手段は、上記共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質的な溝ピッチ、及び上記共鳴現象が検出された位置における反射光の強度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う

ことを特徴とする、請求項 6 記載の分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、表面プラズモン共鳴（SPR）を利用した試料分析のための回折格子型のセンサチップ（表面プラズモン共鳴センサチップ）の構造と、それを用いて行う試料の分析方法及び分析装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、生化学や医療検査等の分野における固相表面における被分析物の分析方法として、表面プラズモン共鳴（SPR）を利用した分析方法が知られている。表面プラズモン共鳴は、金属層に光が入射した場合に金属表面に誘起される表面プラズモン波が入射光により生成されたエバネッセント波に共鳴して励起される現象である。表面プラズモン共鳴は入射光の波長及び角度に依存しており、表面プラズモン共鳴が励起されたときには、特定の入射角又は特定の波長を有する光成分の光エネルギーが表面プラズモン波と共鳴し結合(Coupling)することにより、対応する入射角又は波長を有する反射光が大きく減少するという特徴がある。

【0003】

表面プラズモン共鳴を起こすためには、特定の表面プラズモン波を有する金属と、表面プラズモン波と共鳴するエバネッセント波を誘起する光学構造とが必要となる。エバネッセント波を誘起する光学構造としては現在二つの構造が知られている。一つはプリズムの全反射を利用した光学構造であり、もう一つは回折格子を利用した光学構造である。なお、上記の金属にこれらの光学構造を組み合わせた素子は一般に表面プラズモン共鳴センサチップ（以下、単にセンサチップという）と呼ばれている。

【0004】

通常、センサチップは基体に金属層を積層した構造を有し、金属層上には、特定の検出種（被分析物）と相互作用して特異的に結合する結合物質が塗布されて固定化される。この結合物質が固定化された金属層の表面に試料を接触させることにより、結合物質に試料中の検出種が捕捉される。表面プラズモン共鳴は金属層の表面における媒質の屈折率にも依存しており、媒質の屈折率が変化すれば波長一定の場合には共鳴角が変化し、また、入射角度一定の場合には共鳴波長が変化する。したがって、反射光の強度に基づき共鳴角或いは共鳴波長を調べるこ

で金属層の表面における媒質の屈折率を分析することができる。この場合、金属層の表面の媒質の屈折率の変化は、結合物質に捕捉される検出種の物質質量、すなわち試料中の検出種の濃度の変化に対応していることから、表面プラズモン共鳴が起きる共鳴角或いは共鳴波長を調べることで、試料中の検出種の濃度を分析することができる。

【 0 0 0 5 】

このようなセンサチップのうち、プリズム型のセンサチップは、プリズム内を伝播する光を全反射させ、生起されたエバネッセント波と表面プラズモン波とを結合させるようにしたものである。

一方、回折格子型のセンサチップは、通常、金属が堆積された結果が回折格子になるように基板面に平行な一定ピッチの凹凸形状（グレーティング）を形成し、それに金属を堆積することで金属の回折格子を形成している。そして、高次の回折光を利用して導体表面にエバネッセント波を生起させ、その表面進行波と金属表面の表面プラズモン波の波数及び角振動数が一致した時の共鳴による反射率の低下によって、金属表面又は金属表面に接する物質の性質が検出されるようになっている（特許 1 9 0 3 1 3 5 号，特許 2 5 0 2 2 2 2 号等参照）。

【 0 0 0 6 】

ここで図 1 3 は回折格子型のセンサチップにおける表面プラズモン波，エバネッセント波及び照射光の角振動数 ω と波数 k との関係を示す分散関係図である。図中、曲線 A 1，A 2 は表面プラズモン波の角振動数 ω と波数 k との関係を示しており、曲線 A 1 は曲線 A 2 よりも媒質の屈折率が大きい場合を示している。一方、直線 B 0 は照射光の角振動数 ω と波数 k との関係を示し、直線 B 1 はこの照射光に対応する特定次数のエバネッセント波の角振動数 ω と波数 k との関係を示している。図 1 3 中、曲線 A 1 或いは A 2 と直線 B 1 との交点 P 1 1，P 1 2 が表面プラズモン共鳴が起きる共鳴ポイントを示し、その共鳴ポイントに対応する波長及び入射角が共鳴波長及び共鳴角度となる。この共鳴ポイントでは反射光の強度は極小値を示す。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

回折格子型のセンサチップを用いて行う分析方法には、入射角度一定で波長を変化させる（或いは多成分の光を照射する）波長変化型と、波長一定で入射角度を変化させる角度変化型の2つの方法がある。

このうち、波長変化型では、通常、白色光（多成分の光）を入射角度一定で照射し、各波長の反射光の反射率を計測することによって表面プラズモン共鳴による吸収ピークを計測する。反射率の計測は、通常、計測レンジの制約から図13中に示すように特定領域（角振動数 $\omega_1 \sim \omega_2$ ）の反射光について行われる。

【0008】

ところが、表面プラズモン波は、金属層と試料（誘電体）のそれぞれの誘電率（すなわち屈折率）によって波数と振動数との関係が決まるため、試料の屈折率によっては、図13中に示す共鳴ポイントP12のように、共鳴ポイントが計測レンジから逸脱してしまう虞がある。特に、複数のスポットに異なる結合物質を固定化して幅広い誘電率（屈折率）の分布を持つ試料を検出する場合や、分析時に段階的に生成される新たな物質（例えば、酵素反応により生じる沈着色素など）により各スポットにおける誘電率（屈折率）が変化する場合において、これらのスポットを同時に計測を行うときには、共鳴現象が検出できるスポットと検出できないスポットが混在する虞がある。この場合は、全てのスポットについて共鳴現象を計測するために、入射角度を変更する等の光学系の再調整が必要になってしまう。

なお、全ての共鳴ポイントが計測レンジに入るように、計測レンジを広げて波長帯を広く取るという考えもあるが、波長帯を広く取りすぎると、広範囲の波長が検出できるものの分解能が下がってしまうという新たな課題が生じてしまう。

【0009】

一方、角度変化型には2つの形態が知られている。その第1の形態では、通常、単一波長の光を照射角度を変えながら照射し、各照射角度における反射光を計測することによって、表面プラズモン共鳴による吸収ピークを検出する。しかしながら、この方法においても、光の照射角度に制限があるため、波長変化型と同様に計測レンジに制約が生じてしまう。

【0010】

角度変化型の第2の形態は、図14（a）に示すように、光源102から単波長の光を所定の広がり角を持って照射し、これをセンサチップ101の金属層の表面に垂直でない所定の角度で入射させ、その反射光を反射鏡103を介して光検出器（フォトダイオードアレイ）104で検出するようにしたものである。この場合は、図14（b）に示すようにセンサチップ101での入射位置に応じて照射光の入射角度が変わるので、結果的に角度 θ_a から角度 θ_b まで入射角度を連続的に変えながら単波長の光を照射したことになる。

【0011】

しかしながら、この方法によっても、上述の波長変化型や角度変化型の第1の形態と同様に計測レンジに関する問題は依然としてあり、また、光学系が複雑で装置自体が大型化してしまうという課題もある。更に、反射鏡103が僅かに変形しただけで光路にずれが生じ、測定精度に影響を与えてしまうという課題もある。

【0012】

本発明は、このような課題に鑑み創案されたもので、その第1の目的は、誘電率分布や屈折率分布が広範囲な場合でも、限られた計測レンジにおいて光学系の再調整を行うことなく試料の分析を行えるようにした、表面プラズモン共鳴センサチップ、並びにそれを用いた試料の分析方法及び分析装置を提供することにある。

【0013】

また、その第2の目的は、簡単な光学系により単波長の光による試料の分析を可能にした、表面プラズモン共鳴センサチップ、並びにそれを用いた試料の分析方法及び分析装置を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、発明者は、回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、その回折格子を従来のように一定の均一な溝ピッチで形成するのではなく、光の入射方向から見た実質的な溝ピッチに分布が生じるように形成することで、上記の第1の目的及び第2の目的を達成できるこ

とを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 1 5 】

まず、本発明の第 1 の表面プラズモン共鳴センサチップは、光の照射により金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域をセンサ面に離散的に形成された複数の連続領域として構成し、これら複数の連続領域のうち少なくとも一つの連続領域を他の連続領域とは回折格子の溝ピッチ及び溝方向のうち少なくとも一つの要素が相違したものにしている。なお、ここでいう連続領域とは、共鳴現象の有無の観点において平面的に連続しているセンサ面上の一連の領域を意味している。

【 0 0 1 6 】

このような構成により、特定の方向から見たときの回折格子の実質的な溝ピッチに分布が生じ、各連続領域では実質的な溝ピッチに応じた波数と角振動数との関係を有するエバネッセント波が得られる。これにより、一つの表面プラズモン波に対して角振動数の異なる複数の共鳴ポイントにおいて共鳴現象が生じることになる。

【 0 0 1 7 】

また、本発明の第 2 の表面プラズモン共鳴センサチップは、光の照射により金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域をセンサ面に連続的に形成された連続領域を含むように構成し、この連続領域に設けられた回折格子の溝ピッチには連続的或いは不連続的な分布を持たせている。なお、ここでいう溝ピッチの連続的な分布とは、全ての隣接する溝間において溝ピッチが滑らかに変化していることを意味し、溝ピッチの不連続的な分布とは、少なくとも一つの隣接する溝間において溝ピッチがステップ状に変化していることを意味している。

【 0 0 1 8 】

このような構成により、連続領域上の各位置では溝ピッチに応じた波数と角振動数との関係を有するエバネッセント波が得られる。これにより、一の表面プラズモン波に対して角振動数の異なる複数の共鳴ポイントにおいて共鳴現象が生じ

うることになる。

上記の第 1、第 2 の表面プラズモン共鳴センサチップを試料の定量的及び／又は定性的な分析に用いる場合には、共鳴領域の表面に試料中の検出種（化学種、生化学種又は生物種等）と特異的に結合する結合物質（抗原抗体反応、相補的 DNA 結合、リセプター／リガンド相互作用、酵素／基質相互作用等の相互作用によって検出種を捕捉できる物質）を固定化したものを用いる。そして、以下の光照射ステップ、検出ステップ及び分析ステップからなる分析方法を用いて分析を行う。

【 0 0 1 9 】

光照射ステップは、センサ面に試料を接触させて、所定の方向から光を照射するステップである。また、検出ステップは、共鳴領域からの反射光を受光し、受光した共鳴領域からの反射光の強度に基づき、共鳴領域での共鳴現象を検出するステップである。そして、分析ステップは、共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質的な溝ピッチに基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップである。なお、これらの各ステップは、記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。特に、各ステップを同時に実行する場合には、試料中の被分析物が上記結合物質に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることができる。

【 0 0 2 0 】

上記の分析方法は、以下の構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。この分析装置は、上記の表面プラズモン共鳴センサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態の表面プラズモン共鳴センサチップの共鳴領域に向けて所定の方向から光照射手段により光を照射し、共鳴領域からの反射光を受光手段により受光するような装置構成を有している。

【 0 0 2 1 】

そして、この分析装置は、さらに受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、検出手段と分析手段とを備えている。検出手段は、共鳴領域からの反射光の強度に基づき共鳴領域での共鳴現象を検出する手段であり

、分析手段は、共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質的な溝ピッチに基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である。

【0022】

なお、上記の分析方法における分析ステップでは、共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質的な溝ピッチ、及び共鳴現象が検出された位置における反射光の強度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行ってもよい。この場合、分析装置では、共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質的な溝ピッチ、及び共鳴現象が検出された位置における反射光の強度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うように分析手段を構成すればよい。

【0023】

また、上記の分析方法における光照射ステップでは、単一波長の光を一定の入射角度で照射してもよい。この場合、分析装置では、単一波長の光を一定の入射角度で照射するように光照射手段を構成すればよい。上記の表面プラズモン共鳴センサチップを用いれば、このような簡単な光学系によっても共鳴現象が生じる共鳴ポイントを検出することができる。なお、この場合は、連続的な溝ピッチの分布を有している表面プラズモン共鳴センサチップを用いるのが特に好ましい。

【0024】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。

（A）第1実施形態

まず、図1を用いて本発明の第1実施形態にかかるセンサチップ（表面プラズモン共鳴センサチップ）1の構成について説明する。図1に示すように本実施形態にかかるセンサチップ1は、その表面（センサ面）1aを金属層3により被覆され、金属層3上には回折格子5が形成されている。本実施形態では、回折格子5は均一な溝ピッチではなく、不連続な溝ピッチの分布を持って形成されている。具体的には、回折格子5は溝に垂直な方向に連続する4つの領域51、52、53、54毎に溝ピッチが異なっており、領域51から領域54にかけて順に溝

ピッチを大きく形成されている（すなわち、 $d_1 < d_2 < d_3 < d_4$ ）。

【0025】

この構造によれば、照射光がセンサチップ1のセンサ面1aに照射されると、照射光はセンサ面1a上の回折格子5において回折し、この回折現象によりエバネッセント波が生じる。また、照射光が金属層3に作用することにより金属層3の表面に表面プラズモン波が発生する。そして、特定の波長及び入射角の光が照射されたときにエバネッセント波と表面プラズモン波とが共鳴し、表面プラズモン共鳴（SPR）が起きる。すなわち、このセンサチップ1では、金属層3上の回折格子5が形成されている領域（連続領域）が共鳴領域となっている。

【0026】

センサチップ1の使用時（試料の分析に用いる際）には、図2に示すように回折格子5が形成された共鳴領域上に結合物質6，7が固定化されて、試料中の検出種（化学種，生化学種又は生物種等）と反応する反応領域となる。結合物質6，7は、抗原抗体反応、相補的DNA結合、リセプター／リガンド相互作用、酵素／基質相互作用等の相互作用によって特定の物質と特異的に結合しうる性質を備えた物質であり、検出すべき検出種に応じた結合物質6，7が選択される。ここでは、異なる検出種に対応する結合物質6，7をそれぞれ各領域5.1～5.4に固定化している。

【0027】

ところで、光の照射により金属層3に誘起される表面プラズモン波は、その波数を k_{sp} [$k_{sp} = 2\pi / \lambda_{sp}$ (波長)] とすると、次の式（数1）で表される。

【0028】

【数1】

$$k_{sp}(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m(\omega)n_1(\omega)^2}{\epsilon_m(\omega) + n_1(\omega)^2}}$$

【0029】

また、回折格子5の作用により生じるエバネッセント波は、その波数を k_{ev} [$k_{ev} = 2\pi / \lambda_{ev}$ (波長)] とすると、次の式（数2）で表される。

【 0 0 3 0 】

【 数 2 】

$$k_{ev}(\omega) = \frac{\omega}{c} \sin \theta + m k_g$$

【 0 0 3 1 】

なお、数 1 或いは数 2 において、 ω は照射光の角振動数、 θ は照射光の入射角、 k_g は回折格子 5 の格子定数、 m は回折格子 5 による回折光の回折次数、 $\varepsilon_m(\omega)$ は金属層 3 の誘電率、 $n_1(\omega)$ は金属層 3 の表面に接する媒質の屈折率、 c は光速を示している。

上記の数 1、数 2 の関係を同一のグラフ上に表したものが図 3 に示す分散関係図である。図 3 中、曲線 A 1、A 2 は表面プラズモン波の角振動数 ω と波数 k との関係を示している。数 1 から明らかなように表面プラズモン波は金属層 3 の表面の媒質の屈折率に依存していることから、媒質の屈折率が大きくなると表面プラズモン波の角振動数 ω と波数 k との関係を示す曲線も変化する。具体的には、図 2 に示すように金属層 3 の表面に結合物質 6、7 がスポット状に固定化され、これら結合物質 6、7 にそれぞれ対応する検出種が結合したときには、各スポットにおける屈折率は結合した検出種の屈折率や結合量に応じて変化する。ここでは、結合物質 6 が固定化されたスポットの屈折率のほうが結合物質 7 が固定化されたスポットの屈折率よりも大きく、曲線 A 1 は結合物質 6 が固定化されたスポットに対応し、曲線 A 2 は結合物質 7 が固定化されたスポットに対応している。

【 0 0 3 2 】

一方、図 3 中、直線 B 0 は照射光の角振動数 ω と波数 k との関係を示し、直線 B 1 ～ B 4 はエバネッセント波の角振動数 ω と波数 k との関係を示している。数 2 から明らかなようにエバネッセント波の角振動数 ω と波数 k との関係は格子定数 k_g により変化するが、この格子定数 k_g は光の入射方向から見たときの回折格子 5 の実質的な溝ピッチにより決まり、この実質的な溝ピッチが狭いほど格子定数 k_g は大きくなる。ここでは直線 B 1 は溝ピッチが最も狭い領域 5 1 で得られるエバネッセント波に対応し、以下、直線 B 2 は領域 5 2 に、直線 B 3 は領域 5 3 に、直線 B 4 は領域 5 4 に対応している。上記の曲線 A 1、A 2 とこれら直線

B1～B4との各交点P11, P12, P21, P22, P31, P32, P41, P42が表面プラズモン共鳴が起きる共鳴ポイントを示している。

【0033】

試料中の検出種の濃度は、対応する結合物質6, 7が固定化されたスポットにおける共鳴現象を検出することによって分析することができる。ところが、計測器の計測レンジ（計測波長領域）に制約がある場合には共鳴現象の全てを検出できるわけではない。例えば、計測レンジが ω_1 から ω_2 までの角振動数の範囲に制約されている場合、回折格子5の溝ピッチが狭い領域51～53では、共鳴ポイントP12, P22, P32が計測レンジ外になるため、結合物質7が固定化されたスポットにおける共鳴現象は検出できない。しかしながら、より広い溝ピッチ d_4 を有する領域54では、共鳴ポイントP42が計測レンジ内に入るため、結合物質7が固定化されたスポットにおける共鳴現象を検出することができる。同様に、結合物質6が固定化されたスポットにおける共鳴現象については、領域53, 54ではその共鳴ポイントP31, P41が計測レンジ外になるために検出できないものの、領域51, 52では共鳴ポイントP11, P21が計測レンジ内に入るために計測可能である。

【0034】

このように上記のセンセチップ1によれば、回折格子5の溝ピッチが領域51～54毎に異なることによって、各領域51～54において共鳴現象が生じる共鳴ポイントが表面プラズモン波の分散曲線に沿って分布するので、計測レンジに制約がある場合でも高い確率で何れかの領域51～54において共鳴現象を検出することができる。そして、上述のように複数種の結合物質6, 7を固定化して屈折率が異なる複数の検出種の分析を行う場合にも、限られた計測レンジの中で光学系の再調整を行うことなく一度に分析を行うことができる。すなわち、広範囲の屈折率分布を有する試料の分析にも対応可能である。

【0035】

なお、上記のセンサチップ1は、以下のような方法により製造することができる。まず、図4(a)に示す基体2の表面に、図4(b)に示すようにレーザ加工等により凹凸形状（グレーティング）4を形成する。次いで、図4(c)に示

すように基体 2 の表面全面にスパッタリングや蒸着により金属層 3 を積層する。凹凸形状 4 上に金属層 3 が積層されることで金属層 3 の表面にも凹凸形状が現れ、この金属層 3 の表面の凹凸形状が回折格子 5 として機能する。

【 0 0 3 6 】

基体 2 の材質は、表面に凹凸形状 4 を形成することができ、金属層 3 を保持できる機械的強度が十分であるならばその材質に限定はない。例えば無機材料としてガラス、石英、シリコン等が挙げられ、有機材料としてはポリメタクリル酸メチル、ポリカーボネート、ポリスチレン等の樹脂が挙げられる

基体 2 に形成する凹凸形状 4 は、金属層 3 を積層したときにその表面に所望の回折格子 5 が得られるように金属層 3 の厚み等を考慮して形成する。形成方法としては、上述のレーザ加工の他、射出成型、圧縮成型、エッチング等によって形成してもよい。凹凸形状 4 としては、矩形波形状、正弦波形状、鋸歯状形状等があり得るが、回折格子 5 において回折現象が起き、エバネッセント波を生じせしめることのできる形状であれば形状に限定はない。ただし、凹凸形状 4 の溝ピッチは、連続する 4 つの領域 4 1, 4 2, 4 3, 4 4 毎に異なるようにし、領域 4 1 では溝ピッチを d_1 とし、領域 4 2 では溝ピッチ d_2 、領域 4 3 では溝ピッチ d_3 、領域 4 4 では溝ピッチ d_4 とする。なお、凹凸形状 4 の深さ（回折格子 5 の深さ）は反射光の強度ピークのシャープネスに関係して分解能に影響する。

【 0 0 3 7 】

金属層 3 は、表面プラズモン波を誘起しうるものであればその材質に限定はない。例えば、金、銀、アルミニウム等を用いることができる。感度や安価な点では銀が好ましいが、安定性の面では金が好ましい。なお、金属層 3 の厚みが小さい場合には、照射光が金属層 3 を透過して基体 2 の表面に達し、照射光が基体 2 表面の凹凸形状 4 により回折する場合もある。この場合は凹凸形状 4 が回折格子として機能することになる。

【 0 0 3 8 】

基板 2 への金属層 3 の塗布方法は、基板 2 と金属層 3 が十分に強く結合できる方法ならばその方法に限定はない。代表的には蒸着、スパッタリング、めっき等が挙げられる。また、基板 2 と金属層 3 との間に何らかの別の物質を例えば接着

性を挙げるために使用しても構わない。さらに、金属層 3 の表面に保護膜や活性化膜等をコーティングして、金属層 3 の表面に何らかの機能を保有させるようにしてもよい。

【 0 0 3 9 】

なお、上記のセンサチップ 1 は、図 5 に示すセンサチップ 1' のように変形して実施することも可能である。すなわち、回折格子 5 の溝ピッチが異なる各領域 5 1 ~ 5 4 を連続して並べるのではなく、溝方向を同一にして金属層 3 上に離散的に配置するのである。このような構造によっても、上記のセンサチップ 1 と同様の作用効果を得ることができる。

【 0 0 4 0 】

次に、本実施形態にかかるセンサチップ 1 の使用方法について説明する。

センサチップ 1 を試料の分析に用いる際には、図 2 に示すようにセンサ面 1 a に結合物質 6, 7 を固定化したものを用いる。そして、このように結合物質 6, 7 が固定化されたセンサチップ 1 を図 6 に示す構成の分析装置 1 0 にセットして分析を行う。この分析装置 1 0 はセンサチップ 1 を固定するためのホルダ（保持手段）1 1, 光源（光照射手段）1 2, 光検出器（受光手段）1 3 及び分析部 1 4 から主に構成されている。

【 0 0 4 1 】

ホルダ 1 1 には検出種を含む試料流体が通過する流路 1 1 a が形成されている。センサチップ 1 はそのセンサ面 1 a が流路 1 1 a を流れる試料に接するように配置されて固定される。

光源 1 2 はセンサチップ 1 のセンサ面 1 a に向けて光を照射するようにセンサチップ 1 に対して流路 1 1 a を挟んで配置される。光源 1 2 は単色光でもよく、多成分の光（例えば白色光）でもよい。また、コヒーレントな光であるか否かも問わない。単色光の光源としては、レーザ光源、特に価格、大きさの点で半導体レーザが好ましい。また、ハロゲン・タングステンランプなどの白色光を干渉フィルターや分光器等で分光して得た単色光を光源として用いることも可能である。一方、白色光の光源としては、ハロゲン・タングステンランプ、キセノンランプ等が好ましい。

【 0 0 4 2 】

光検出器 1 3 はセンサチップ 1 からの反射光を検出する検出器である。光検出器 1 3 としては、例えば CCD 素子を集積したものやシリコンフォトダイオードアレイ等が好ましい。なお、図中では省略しているが、P 偏光のみが表面プラズモン波を共鳴させることができるため、光源 1 2 とセンサチップ 1 との間、またはセンサチップ 1 と光検出器 1 3 との間には、光源 1 2 からの照射光、或いはセンサチップ 1 からの反射光を偏光するための偏光子が設置されている。

【 0 0 4 3 】

分析部 1 4 は光検出器 1 3 からの検出情報に基づき分析処理を行う装置である。分析部 1 4 は、本発明にかかる検出手段及び分析手段として機能する。以下、分析部 1 4 の各機能とあわせて、本実施形態にかかるセンサチップ 1 を用いた試料の分析手順について具体的に説明する。

まず、センサチップ 1 をホルダ 1 1 にセットしてセンサチップ 1 のセンサ面 1 a を試料に接触させる（ステップ A 1）。これによりセンサ面 1 a に固定された結合物質 6, 7 に試料流体中の検出種が特異的に結合する。そして結合した検出種の物質質量に応じて結合物質 6, 7 が固定化された各スポットの金属層 3 表面近傍の媒質の屈折率が変化し、各スポットにおける表面プラズモン波の共鳴条件が変化する。

【 0 0 4 4 】

次に、光源 1 2 からセンサ面 1 a に向けて照射角度一定で単色光を照射する（ステップ A 2）。ここでは、結合物質 6, 7 が固定化された全スポットを照らすように照射光の太さを調整する。これにより、全てのスポットを同時に測定することができる。センサ面 1 a に照射された照射光は表面に形成された回折格子 5 において回折光を生じさせる。このうち 0 次の回折光（反射光）を光検出器 1 3 によって検出する（ステップ A 3）。

【 0 0 4 5 】

光検出器 1 3 により検出された反射光の情報は分析部 1 4 に送られる。分析部 1 4 は、光検出器 1 3 からの反射光の情報から結合物質 6, 7 が固定された各スポットからの反射光の情報を抽出して、スポット毎に反射光の強度を調べる。そ

して、各スポットからの反射光の強度に基づき、検出種毎（結合物質 6，7 毎）に共鳴現象が生じる回折格子 5 の溝ピッチを検出する。具体的には、検出種毎に反射光の強度が最小となるスポットを検出し、そのスポットにおいて共鳴現象が生じているものと見なすか、或いは、ソフトウェアを用いて各スポットの反射光の強度に基づき共鳴現象が生じる溝ピッチを補間計算する。ここでは分析部 1 4 は本発明にかかる検出手段として機能する（ステップ A 4）。

【0046】

そして、分析部 1 4 は、共鳴現象が生じる溝ピッチを別途測定して得られた検量線（或いは理論的な濃度換算式）に対応させて、試料中の各検出種の濃度を分析する。ここでは分析部 1 4 は本発明にかかる分析手段として機能する（ステップ A 5）。

このような手法により分析を行うことで、従来の方法のように光学系の再調整等の煩雑な操作の必要がなく、且つ、従来の角度変化型に比較して簡単な装置構成、特に、簡単な光学系により試料の分析が可能になる。なお、上記の各ステップ A 1 ～ A 5 は、上述のように順に実行する他に同時に実行することも可能である。各ステップを同時実行する場合には、試料中の検出種が結合物質 6，7 に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることが可能になる。

【0047】

なお、ここでは単一波長の光を単一の角度（固定角度）で照射する方法について説明したが、単一波長の光を照射角度を変化させながら照射する方法にも本実施形態にかかるセンサチップ 1 を用いることができる。この方法では、反射光強度に基づき共鳴現象が生じる溝ピッチを計測（または補間計算）し、共鳴現象が生じる溝ピッチ、及び共鳴現象が検出された位置における反射光の強度（実際には、反射光強度から測定された共鳴角）に基づき、別途測定して得られた検量線（或いは理論的な濃度換算式）から試料中の検出種の濃度を分析する。

【0048】

また、ここでは光源 1 2 として単色光を用いる場合について説明したが、白色光を光源 1 2 に用いる場合には、図 3 に示すように計測レンジ（ $\omega 1 \sim \omega 2$ ）内にある全ての共鳴ポイント P 1 1，P 2 1，P 4 2 を一度に検出することができ

る。したがって、結合物質 6 に対応する検出種の濃度は、共鳴ポイント P 1 1 に対応する溝ピッチ d_1 及び共鳴現象が検出された位置（領域 5 1）における反射光の強度（実際には、反射光強度から測定された共鳴波長）に基づき、或いは、共鳴ポイント P 2 1 に対応する溝ピッチ d_2 及び共鳴現象が検出された位置（領域 5 2）における反射光の強度に基づき、別途測定して得られた検量線（或いは理論的な濃度換算式）から、分析することができる。一方、結合物質 7 に対応する検出種の濃度は、共鳴ポイント P 4 2 に対応する溝ピッチ d_4 及び共鳴現象が検出された位置（領域 5 4）における反射光の強度に基づき、分析することができる。

【0049】

（B）第 2 実施形態

次に、図 7 を用いて本発明の第 2 実施形態にかかるセンサチップ（表面プラズモン共鳴センサチップ）2 1 の構成について説明する。

本実施形態にかかるセンサチップ 2 1 は、第 1 実施形態と同様その基本構成は従来のセンサチップと共通しており、表面（センサ面）2 1 a を金属層 2 3 により被覆され、金属層 2 3 上に回折格子 2 5 が形成されている。本実施形態では、回折格子 2 5 は連続的な溝ピッチの分布を持って形成されている。具体的には、図 8 は図 7 中の矢印 X 方向における溝ピッチを示したものであるが、図 8 中に実線で示すように隣接する溝間で溝ピッチが滑らかに変化するように回折格子 2 5 が形成されている。なお、図 8 中の一点鎖線は第 1 実施形態のセンサチップにおける溝ピッチの変化を示したものであり、二点鎖線は従来のセンサチップにおける溝ピッチの変化を示したものである。

【0050】

光の照射により回折格子 2 5 で発生するエバネッセント波の波数は、数 2 に示すように回折格子 2 5 の格子定数に依存し、この格子定数は回折格子 2 5 の溝ピッチに依存することから、上記のような構造によれば、一定の波数の照射光に対して連続的な波数の分布を有するエバネッセント波を得ることができる。この場合、表面プラズモン波、エバネッセント波それぞれの角振動数 ω と波数 k との関係を示す分散関係図は図 9 に示すようになる。

【 0 0 5 1 】

図 9 において、符号 C で示す帯域が回折格子 2 5 全体で発生するエバネッセント波の角振動数 ω と波数 k との関係を示しており、これは入射光の角振動数 ω と波数 k との関係を示す直線 B 0 に平行な直線の集合である。そして、ここでは、曲線 A 1, A 2 が帯域 C に重なる範囲である線分 S 1 S 2, S 3 S 4 が、表面プラズモン共鳴が起きる範囲を示している。

【 0 0 5 2 】

このように表面プラズモン共鳴が起きる範囲が連続的に存在することにより、単波長の光を一定の入射角度で照射した場合でも回折格子 2 5 上の何れかの位置において共鳴現象が発生する。例えば図 9 において、ある角振動数 ω_x の光を照射した場合、曲線 A 1 上の角振動数 ω_x の点 P x が、共鳴現象が起きる共鳴ポイントとなる。この共鳴ポイント P x を通るエバネッセント波（直線 B x で示す）が、曲線 A 1 で示す表面プラズモン波と共鳴するエバネッセント波である。そして、この直線 B x に対応する溝ピッチを与える回折格子 2 5 上の位置が、実際に共鳴現象が起きている位置である。

【 0 0 5 3 】

本実施形態にかかるセンサチップ 2 1 によれば、回折格子 2 5 上の何れかの位置において共鳴現象が発生するので、共鳴現象が発生する溝ピッチを求めるにあたり第 1 実施形態のような近似や補間計算を用いる必要がない。したがって、図 6 の分析装置を用いて試料の分析を行う場合には、反射光の強度から共鳴現象が発生している位置を検出し、その位置における溝ピッチ（波長変化型の場合は、さらに反射光強度から測定された共鳴波長、角度変化型の場合は、さらに反射光強度から測定された共鳴角度）を検量線に照合するだけでよく、より簡単に且つより正確に試料中の検出種の濃度を分析することが可能になる。

【 0 0 5 4 】

（C）第 3 実施形態

次に、図 1 0 を用いて本発明の第 3 実施形態にかかるセンサチップ（表面プラズモン共鳴センサチップ）3 1 の構成について説明する。

本実施形態にかかるセンサチップ 3 1 は、従来同様に表面（センサ面）3 1 a

を金属層 3 3 により被覆されて金属層 3 3 上に回折格子 3 5 が形成されたものであるが、ここでは金属層 3 3 上に複数の測定領域 3 8 a ~ 3 8 d が離散的に設けられ、これら測定領域 3 8 a ~ 3 8 d 毎に回折格子 3 5 が形成されている。

【 0 0 5 5 】

各測定領域 3 8 a ~ 3 8 d に形成された回折格子 3 5 は、溝ピッチは同一であるが、溝方向が全て異なっている。すなわち、測定領域 3 8 a における回折格子 3 5 の溝方向を基準としたとき、測定領域 3 8 b での溝方向は $\theta 2$ だけ傾き、測定領域 3 8 c での溝方向は $\theta 3$ だけ傾き、測定領域 3 8 d での溝方向は $\theta 4$ だけ傾いている。このため、測定領域 3 8 a での溝方向と垂直な方向から見たときには、測定領域 3 8 a での溝ピッチは $d 1$ であるのに対し、測定領域 3 8 b での実質的な溝ピッチ $d 2$ は $d 1 / \cos \theta 2$ 、測定領域 3 8 c での実質的な溝ピッチ $d 3$ は $d 1 / \cos \theta 3$ 、測定領域 3 8 d での実質的な溝ピッチ $d 4$ は $d 1 / \cos \theta 4$ となる。傾斜角度間の大小関係を $\theta 2 < \theta 3 < \theta 4$ とすると、実質的な溝ピッチ間の大小関係は $d 1 < d 2 < d 3 < d 4$ となり、測定領域 3 8 a ~ 3 8 d 毎に実質的な溝ピッチが異なることになる。

【 0 0 5 6 】

したがって、本実施形態にかかるセンサチップ 3 1 によれば、特定の一方方向から光を照射すれば、各測定領域 3 8 a ~ 3 8 d においてその光の照射方向に対する実質的な溝ピッチに応じた波数のエバネッセント波が生じ、これにより表面プラズモン波とエバネッセント波とが共鳴する共鳴ポイントにも分布が生じるので、第 1 実施形態と同様、計測レンジに制約がある場合でも広範囲の屈折率分布を有する試料の分析に対応することができる。

【 0 0 5 7 】

(D) その他

以上、本発明の実施の形態について説明したが、上述の実施形態はあくまでも本発明の一実施形態であり、本発明の実施形態がこれに限定されるものではない。

例えば、第 1 実施形態の変形例（図 5 参照）では、離散的に配置された各領域 5 1 ~ 5 4 の溝方向を同一にしていたが、図 1 1 に示すセンサチップ 1" ように

一部の領域 5 4 の溝方向が他の領域 5 1 ～ 5 3 と異なっていたり、或いは全ての領域 5 1 ～ 5 4 の溝方向が異なっていたりしてもよい。この場合、領域 5 1 ～ 5 4 毎に光の照射方向を変えて溝方向に垂直に光を照射すれば、第 1 実施形態と同様の作用効果が得られる。

【 0 0 5 8 】

また、図 1 2 に示すように溝ピッチが異なる複数のセンサチップ 4 1 A ～ 4 1 D を用意し、これらを一つのセンサチップ 4 1 として使用することによっても、第 1 実施形態と同様の作用効果が得られる。

さらに、上述の実施形態では、従来の一般的な構造の回折格子型センサチップを用いた場合について説明したが、本発明は他の様々な構造の回折格子型センサチップを用いても実施することができる。すなわち、試料と接するセンサ面と、センサ面の近傍に設けられ表面プラズモン波を誘起しうる金属層と、センサ面の近傍に設けられ照射光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子とを備えたセンサチップであれば、本発明を適用することができる。

【 0 0 5 9 】

以上例を挙げたように、本発明はその趣旨を逸脱しない範囲で種々変形して実施することができる。

【 0 0 6 0 】

【発明の効果】

以上詳述したように、本発明によれば、光の照射方向に対する回折格子の実質的な溝ピッチに分布が存在することにより、回折により生じるエバネッセント波の波数と角振動数との関係にも実質的な溝ピッチに応じた分布が生じ、これにより一の表面プラズモン波に対して角振動数の異なる複数の共鳴ポイントにおいて共鳴現象が生じうるので、誘電率分布や屈折率分布が広範囲な場合でも、光学系の再調整を行うことなく試料の分析を行うことができる。

【 0 0 6 1 】

また、本発明によれば、簡単な光学系により試料の分析を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明のセンサチップの第 1 実施形態を示す模式的な斜視図である。

【図 2】

図 1 のセンサチップに結合物質を固定化した状態を示す模式的な斜視図である。

【図 3】

図 1 のセンサチップの光学的特性を示す分散関係図である。

【図 4】

図 1 のセンサチップの製造方法の一例を示す模式的な斜視図であり、(a) ～ (c) の順に製造手順を示している。

【図 5】

本発明の分析装置の一実施形態を示す模式的な模式図である。

【図 6】

図 1 のセンサチップの変形例を示す模式的な斜視図である。

【図 7】

本発明のセンサチップの第 2 実施形態を示す模式的な斜視図である。

【図 8】

図 7 のセンサチップにおける溝ピッチの分布を示す図である。

【図 9】

図 7 のセンサチップの光学的特性を示す分散関係図である。

【図 10】

本発明のセンサチップの第 3 実施形態を示す平面図である。

【図 11】

図 5 に示すセンサチップの変形例を示す模式的な斜視図である。

【図 12】

本発明のセンサチップの別実施形態を示す模式的な斜視図である。

【図 13】

従来のセンサチップの特性を示す分散関係図である。

【図 14】

(a) は従来の角度変化型の分析装置の光学系を示す模式図であり、(b) は

センサチップへの光の照射状態を拡大して示す図である。

【符号の説明】

1, 1', 1'', 2 1, 3 1, 4 1 センサチップ (表面プラズモン共鳴センサチップ)

1 a, 2 1 a, 3 1 a センサ面

2 基体

3, 2 3, 3 3 金属層

4 凹凸形状

5, 2 5, 3 5 回折格子

6, 7 結合物質

1 0 分析装置

1 1 ホルダ

1 1 a 流路

1 2 光源

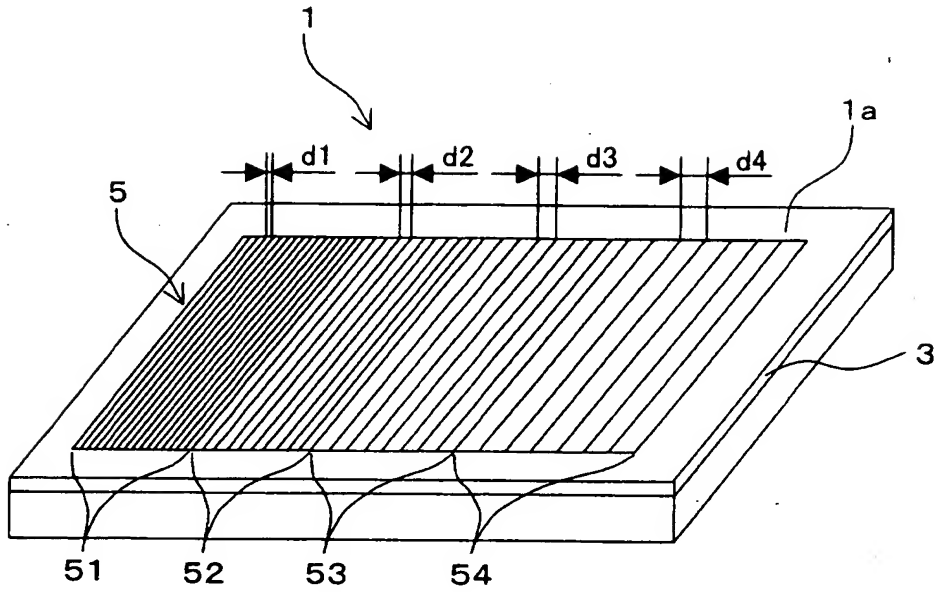
1 3 光検出器

1 4 分析部

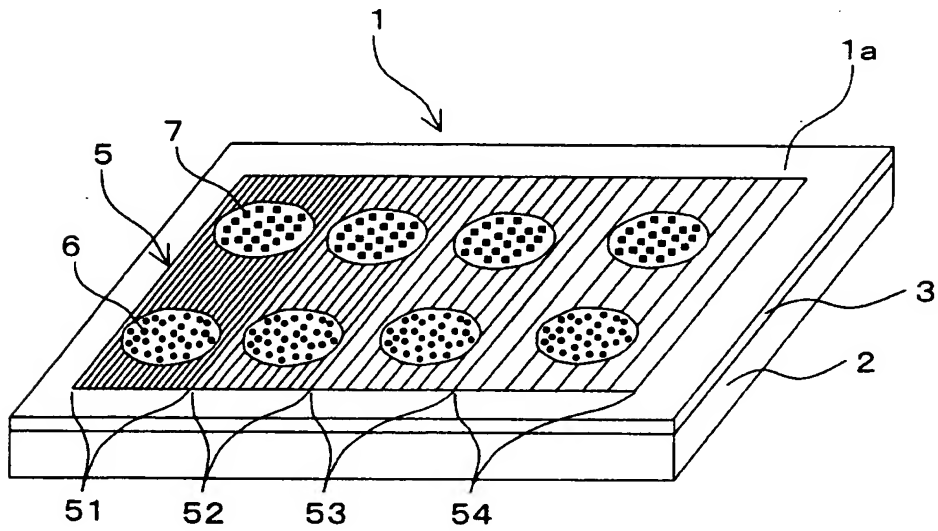
3 8 a ~ 3 8 d, 5 1 ~ 5 4 測定領域 (連続領域)

【書類名】 図面

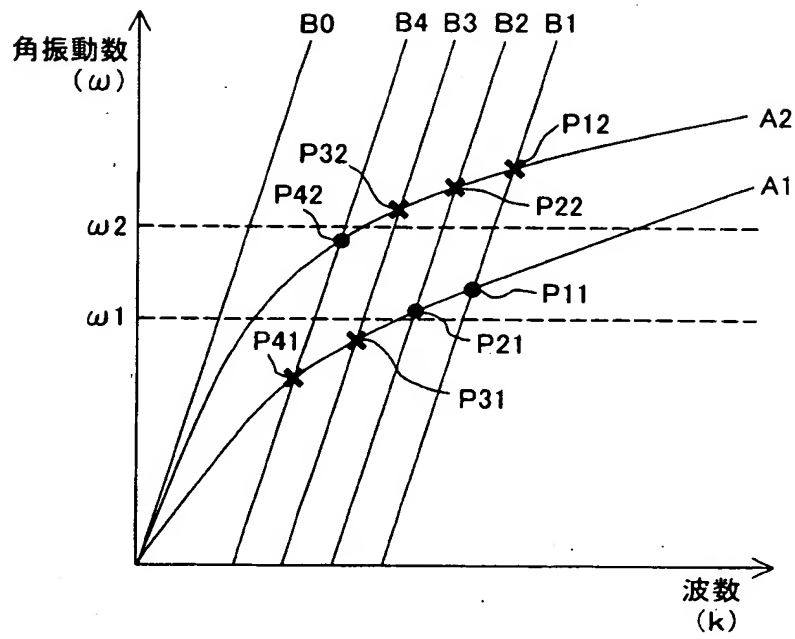
【図 1】



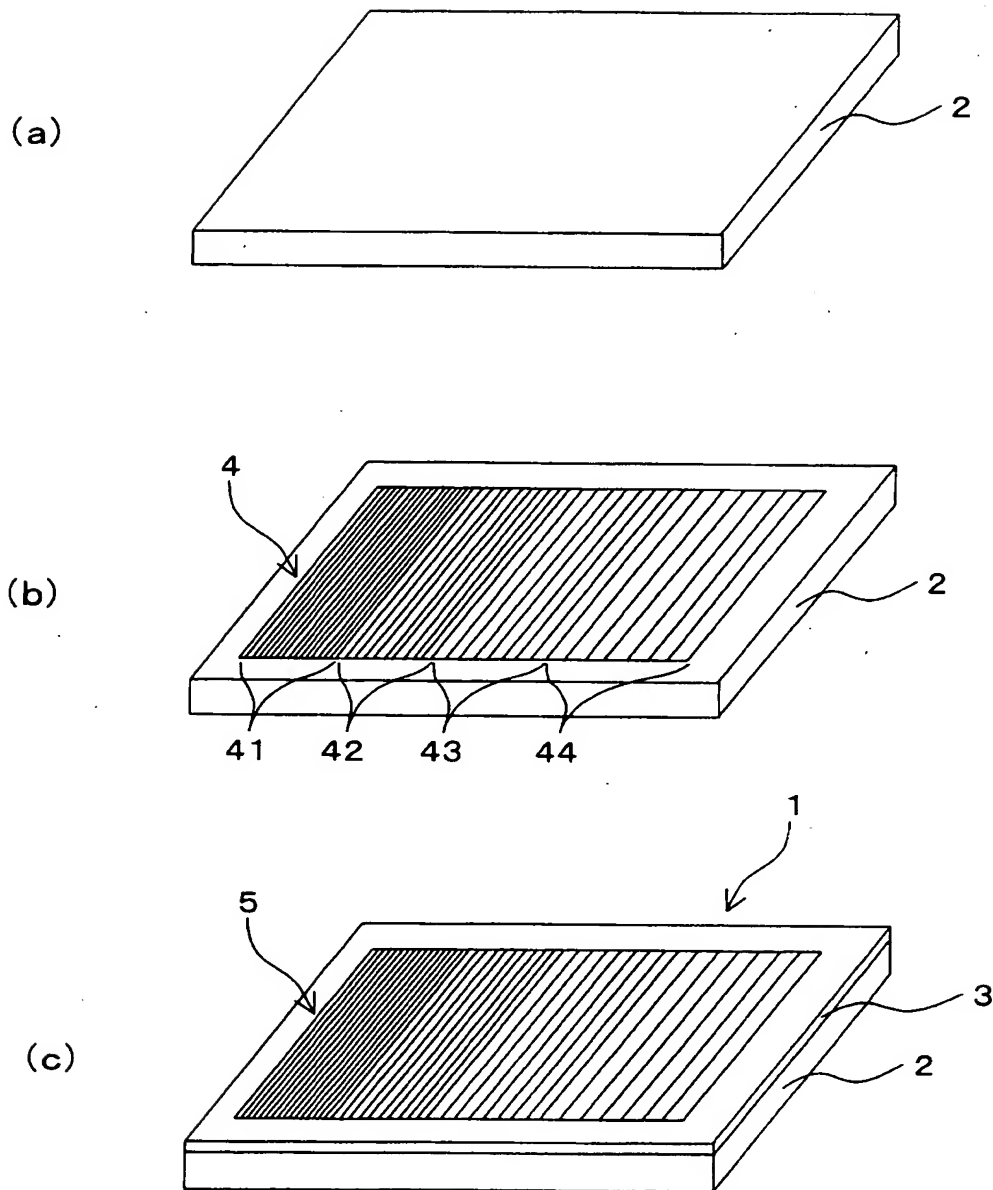
【図 2】



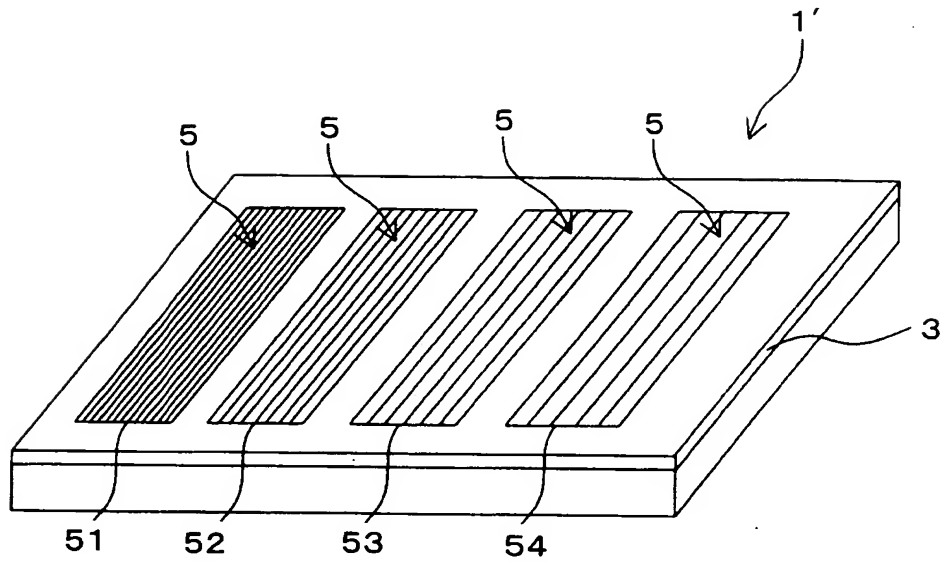
【図 3】



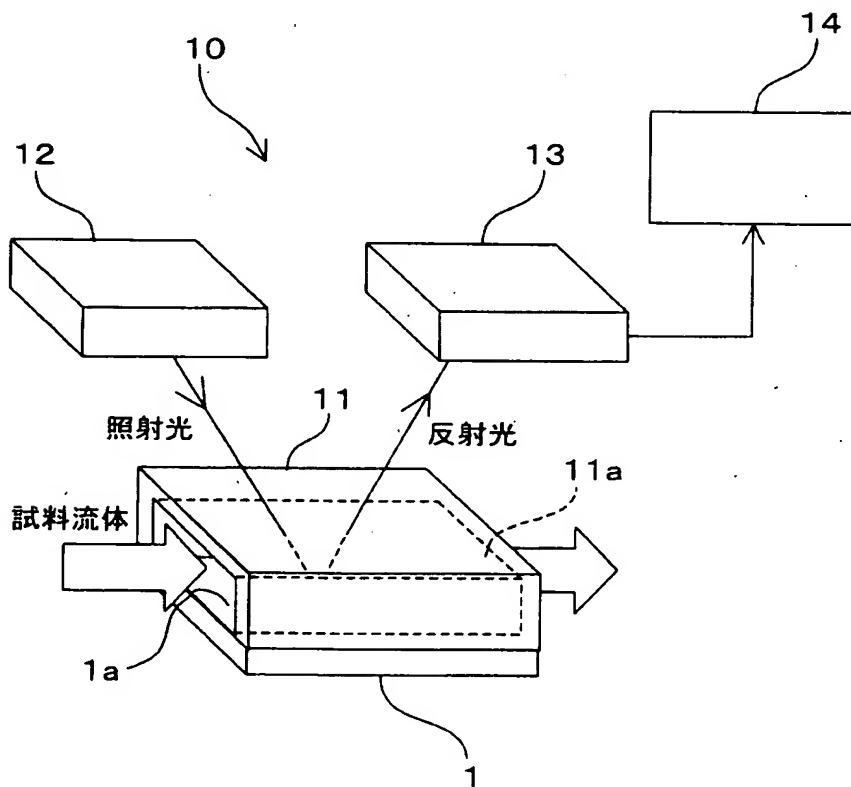
【図 4】



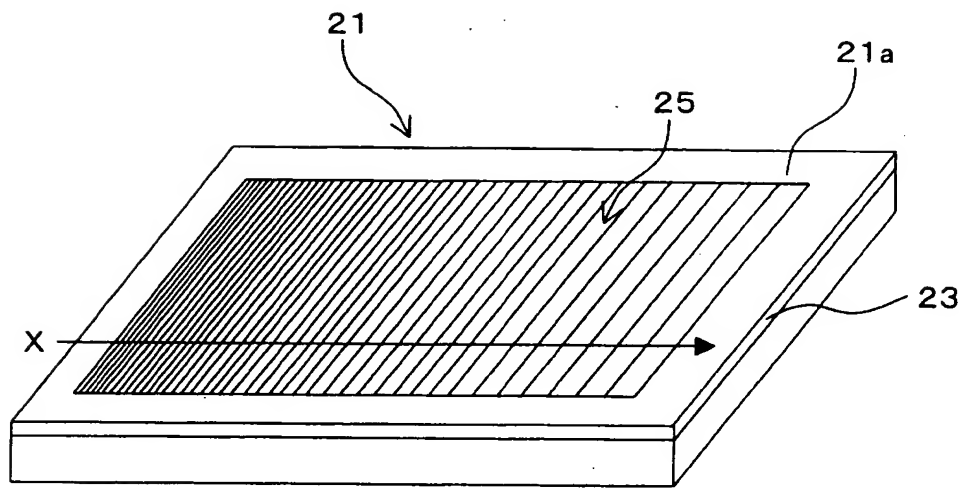
【図 5】



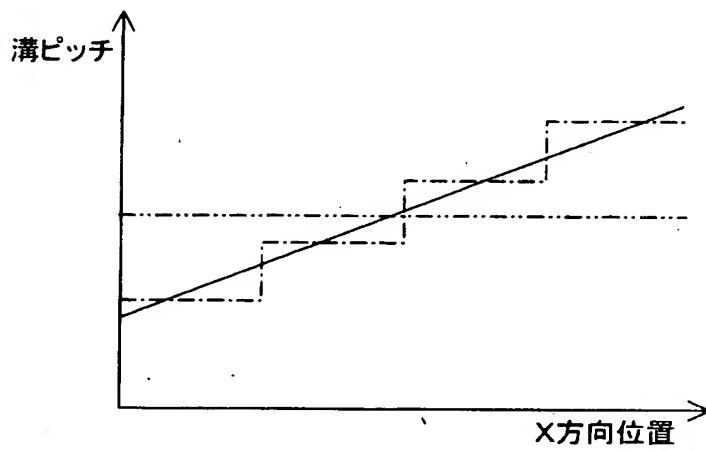
【図 6】



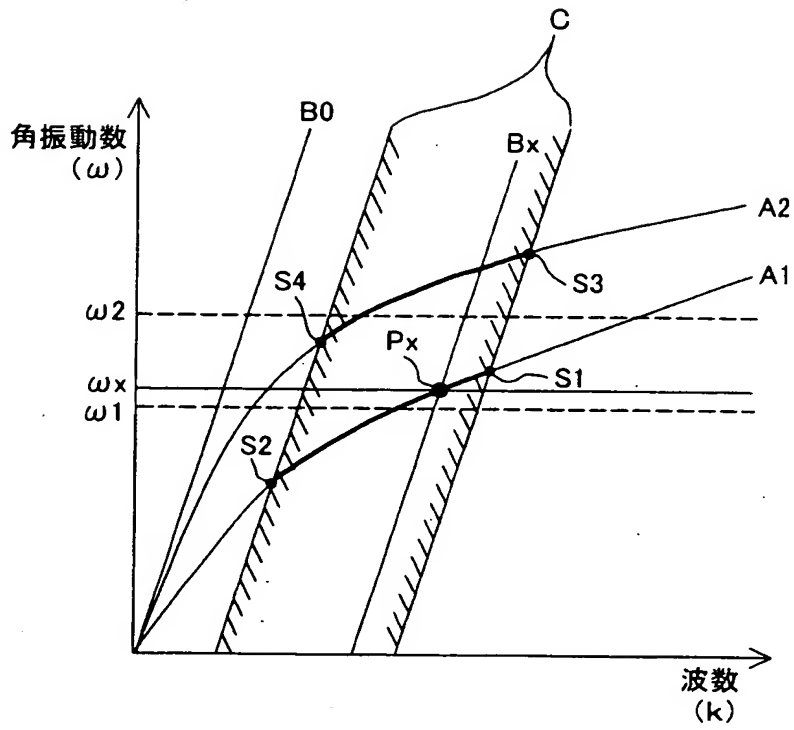
【図 7】



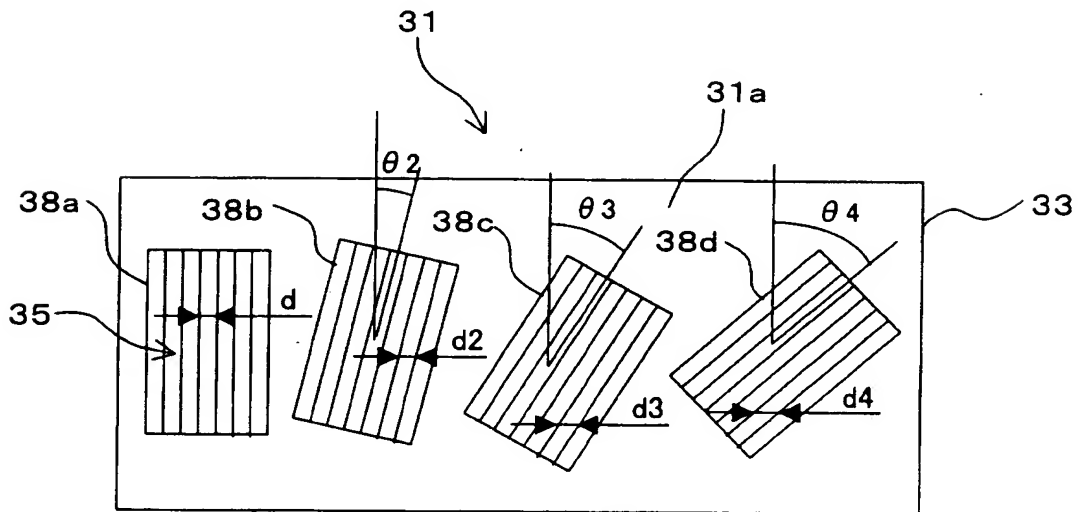
【図 8】



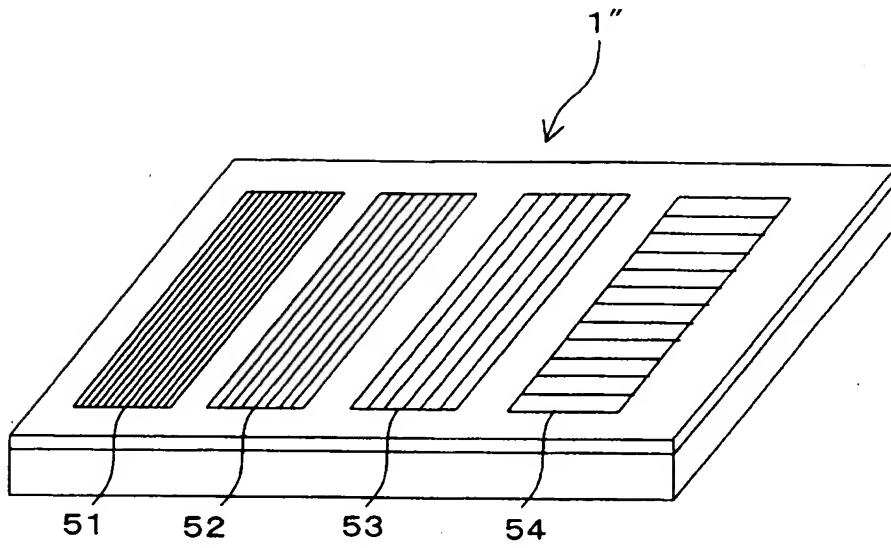
【図 9】



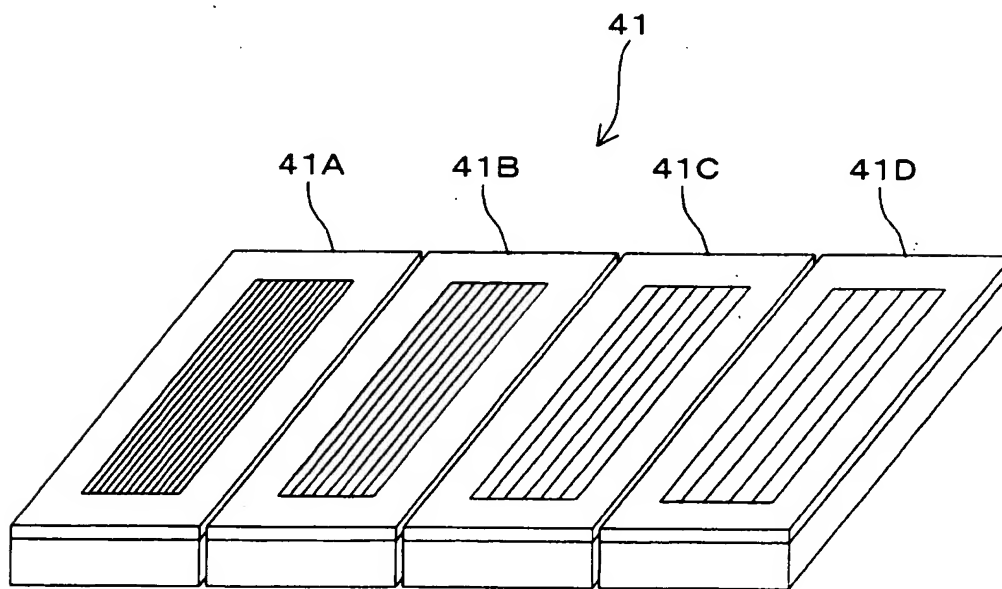
【図 10】



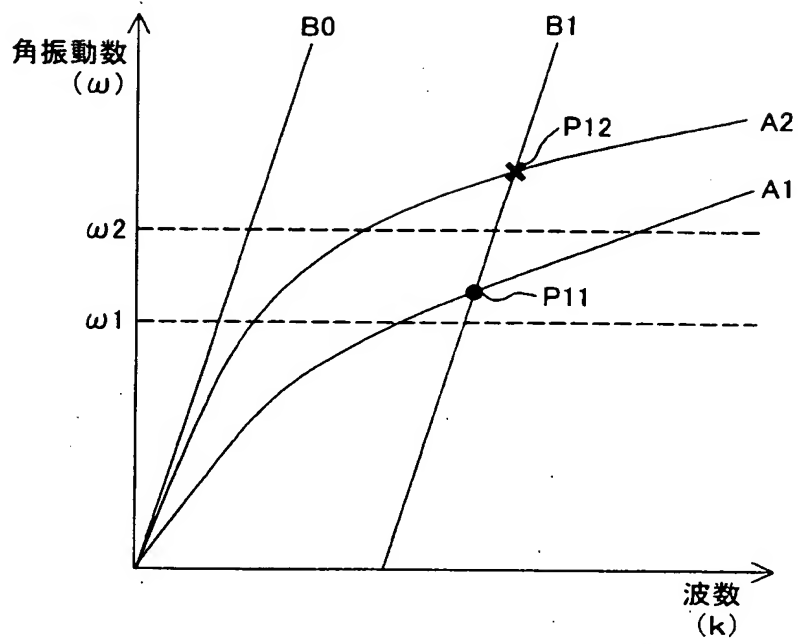
【図 1 1】



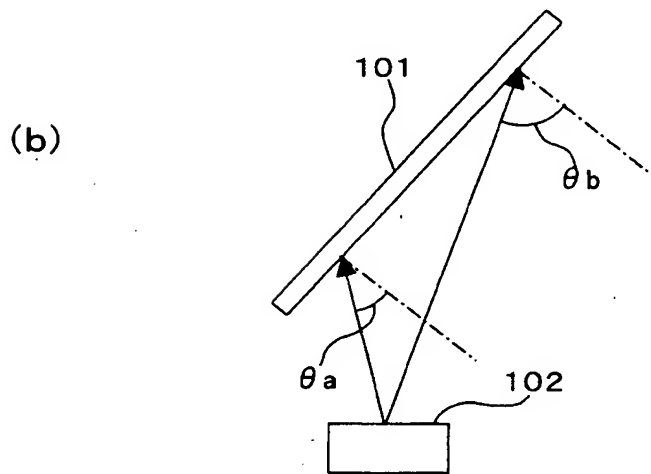
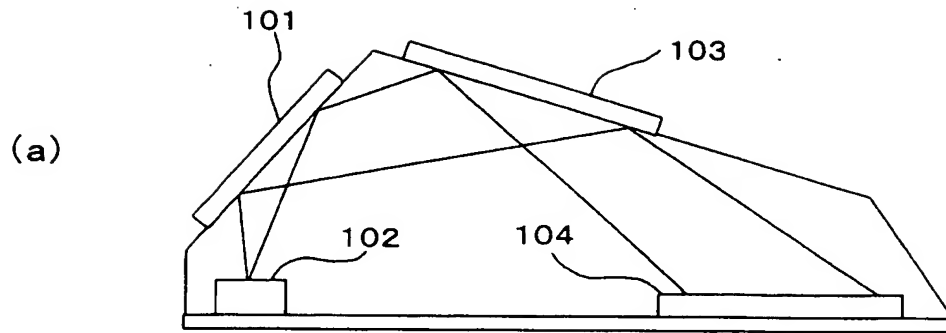
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップを用いた試料の分析において、誘電率分布や屈折率分布が広範囲な場合でも、限られた計測レンジにおいて光学系の再調整を行うことなく試料の分析を行えるようにする。

【解決手段】 表面プラズモン共鳴センサチップ 1 の回折格子 5 を従来のように一定の均一な溝ピッチで形成するのではなく、光の入射方向から見た実質的な溝ピッチに分布（ d_1 ， d_2 ， d_3 ， d_4 ）が生じるように形成する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005968]

1. 変更年月日	1994年10月20日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
氏 名	三菱化学株式会社